

**Mariele Fernanda da Cruz Panegossi**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM FILHOTES  
CANINOS**

**Araçatuba**

**2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Campus de Araçatuba – Faculdade de Medicina Veterinária

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM FILHOTES CANINOS

Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médica Veterinária.

**Aluna: Mariele Fernanda da Cruz Panegossi**

**Supervisora: Prof<sup>a</sup>. Adj. Katia Denise Saraiva  
Bresciani**

**Araçatuba**

**2014**

## **ENCAMINHAMENTO**

Encaminhamos o presente Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso, para que o Conselho de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis.

---

**Mariele Fernanda da Cruz Panegossi**

---

**Profª. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani**

**ARAÇATUBA**  
**Junho de 2014**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. METODOLOGIA.....	3
2.1 Delineamento experimental.....	3
2.2 Colheita e processamento das amostras.....	3
2.3 Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	4
2.4 Análise estatística .....	5
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	5
4. CONCLUSÃO.....	6
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Cryptosporidium* spp. EM FILHOTES CANINOS

Mariele Fernanda da Cruz Panegossi

### RESUMO

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* pertencem ao filo Apicomplexa, com localização intracelular e extracitoplasmática obrigatória e se desenvolvem principalmente na superfície das células epiteliais de hospedeiros vertebrados. O cão, possível fonte de infecção humana, elimina oocistos fecais deste protozoário com grande potencial zoonótico no ambiente. O presente estudo teve como objetivo caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* spp. obtidos de amostras fecais de filhotes caninos (naturalmente infectados). Um total de 200 cães foram examinados, sendo 100 machos e 100 fêmeas, 111 de padrão racial determinado e 89 sem raça definida (SRD). Destes, 81 animais, 43, 48 e 28 tinham até dois, de dois a três; de três a seis e de seis a doze meses, respectivamente. Conforme sua origem, os animais eram provenientes dos Municípios de Araçatuba e Votuporanga, SP, sendo que 126 eram de domicílios; 11 mantidos em Centros de Zoonoses; 50 de Pet Shops; 12 de um criatório e uma (0,5%) era errante e havia sido adotada. A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi de 1% (2/200). Ambas eram fêmeas, SRD, com idade entre 60 e 90 dias. A de origem residencial apresentava fezes pastosas com coloração castanho claro e a outra, resgatada do CCZ, material fecal escurecido de consistência liquefeita. O sequenciamento dos fragmentos amplificados confirmou a presença de *Cryptosporidium canis*. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que 2% dos caninos analisados eram hospedeiros de *C. canis*.

**PALAVRAS-CHAVES:** Epidemiologia, Endoparasitose, Cães, Saúde pública.

## 1. INTRODUÇÃO

Parasitas intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa, são coccídios do gênero *Cryptosporidium* capazes de se desenvolver nas microvilosidades das células do epitélio gastrintestinal de hospedeiros vertebrados (XIAO et al., 2004; KARANIS & ALDEYARBI, 2011; CHALMERS & KATZER, 2013).

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, este parasito tornou-se importante patógeno em humanos (FAYER, 2010), sendo associado principalmente a baixo poder socioeconômico e precárias condições de saneamento básico da população (SAVIOLI et al., 2006; ASSIS et al., 2013).

Cães eliminam oocistos fecais, com ou sem diarreia, sendo considerados potenciais fontes de infecção humana (SMITH et al., 2009; WANG et al., 2010; YOSHIUCHI et al., 2010), apesar de isto não ter sido confirmado experimentalmente (BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010; UEHLINGER et al., 2013).

As formas de transmissão documentadas são de animais para o homem, de pessoa para pessoa, por meio de ingestão hídrica ou água destinada a lazer que são contaminados direta ou indiretamente com resíduos fecais com a presença de oocistos esporulados (SMITH et al., 2006).

O genótipo canino de *Cryptosporidium parvum* foi designado como uma nova espécie, denominada *Cryptosporidium canis* (FAYER et al., 2001), com base nos resultados dos experimentos de transmissão cruzada bem como análises genéticas. Estudos moleculares indicaram que cães podem transmitir o genótipo bovino de *C. parvum*, que é conhecido por ser patogênico para humanos (ABE et al., 2002).

Apesar das espécies *C. parvum*, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis* e *C. muris* terem sido isoladas em seres humanos, o risco de infecção humana por contato direto ou indireto com animais de companhia ainda é indeterminado (CACCIÓ et al., 2002, SMITH et al., 2009).

Os cães eliminam oocistos fecais comumente em infecções crônicas e subclínicas, representando uma potencial fonte de infecção humana (MUNDIM et al., 2007, SMITH et al., 2009), com questionamentos da importância desta espécie animal em saúde pública (ABE et al., 2002, BOWMAN & LUCIO-FORSTER, 2010).

As investigações da ocorrência de *Cryptosporidium* na espécie canina por meio da reação em cadeia da polimerase no Brasil, foram realizadas por Lallo, 2006, Thomaz et al., 2007 e por Greca et al., 2010.

Os animais domésticos, especialmente cães e gatos, representam significantes benefícios para as pessoas e para a sociedade. Eles contribuem com o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças e como bem-estar de seus proprietários, em particular de idosos. No entanto, esses “pets” podem constituir importante fonte de contaminação para seres humanos, principalmente as com potencial zoonótico como a criptosporidiose (LIMBERT et. al, 2009)

O objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente *Cryptosporidium* spp. de amostras fecais de cães positivos, a partir da reação em Cadeia de Polimerase-Nested (Nested-PCR).

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Delineamento experimental**

Neste estudo, foram colhidas 200 amostras fecais de filhotes de cães de ambos os sexos e de raças diversas, com até 12 meses de idade, provenientes de pet shops, domicílios, campanhas de adoção, do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) dos municípios de Araçatuba, São Paulo (SP) e Votuporanga, SP e de criadores.

Deste total, metade eram machos e metade fêmeas. Na distribuição da faixa etária, 81, 43, 48 e 28 tinham de um a 60, de 61 a 90, 91 a 180 e 181 a 365 dias, respectivamente. De acordo com a origem dos animais, 126 eram domiciliados; 11 provenientes do CCZ; 50 cães de Pet Shops; 12 de criadores e um não tinha dono. Em relação às raças dos cães, eram 111 de raça definida e 89 sem raça definida (SRD).

### **2.2 Colheita e processamento das amostras**

As 200 amostras fecais foram armazenadas em microtubos e congeladas “in natura” a -20°C até a execução da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### **2.3 Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp**

A Reação em Cadeira de Polimerase-Nested (Nested-PCR) foi realizada em todas as amostras fecais. Para tanto, a alíquota de fezes “in natura”, armazenada em -20°C foi descongelada e filtrada em tamis de plástico descartável contendo gaze.

Após filtração o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio cônicos e centrifugado a 4000 xg por cinco minutos para sedimentação fecal, eliminando-se ao término o sobrenadante, o sedimento foi acrescido de água/éter e após homogeneização, centrifugado a 3000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, com oocistos, foi submetido ao “kit” de extração de DNA genômico “QIAamp DNA Stool Mini Kit” (Qiagen®), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante, com exceção da incubação à 99° C após diluição dos oocistos em tampão ATL e eluição do DNA em 50 µL. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

- **Reação de Nested-PCR para amplificação de fragmento da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico de *Cryptosporidium* spp**

Para amplificação de fragmentos do gene da subunidade 18S do RNA ribossômico utilizou-se a técnica de Nested-PCR com os primers 5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3' e 5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3' para a reação primária, com 1325 pares de base (pb) e 5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3' e 5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3' para a reação secundária (826-840 pb). Esta técnica permite a amplificação de fragmentos de DNA de todas as espécies e genótipos de *Cryptosporidium* conhecidos. Para realização das seguintes condições de reação, preparou-se uma solução com volume final de 25µL contendo: 2,5 µL de tampão para PCR 10 x, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 100 nM de cada oligonucleotídeo (primer) e 5 µL de DNA alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 94° C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos, cada um consistindo em desnaturação por 45



segundos a 94° C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 60 segundos de extensão a 72° C, com extensão final a 72°C por 7 minutos (XIAO et al., 2000).

- **Sequenciamento dos fragmentos amplificados**

Os fragmentos resultantes das reações de PCR foram purificados por kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen™), segundo as recomendações do fabricante, e submetidos a sequenciamento, utilizando-se o DYEnamic®ET dye terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™). As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicata e nas duas direções.

A determinação da sequência-consenso foi realizada com o uso do programa computacional CodonCode Aligner v.1.5.2. (CodonCode Corp. Dedham™). Somente consideraram-se nucleotídeos com valores de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 20. Após determinação da sequência-consenso dos fragmentos amplificados por PCR, as mesmas foram alinhadas com o auxílio dos programas CLUSTAL\_X (Thompson et al., 1997) e BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank.

## **2.4 Análise estatística**

A análise dos dados constituiu-se de estatística descritiva e análise inferencial (teste exato de Fisher) para verificar possíveis associações das variáveis de interesse. Para a elaboração do banco de dados foi utilizado o Microsoft Office Excel 2010, e as análises estatísticas foram efetuadas com o programa computacional SAS® (Statistical Analysis System) versão 9.3 As estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir das análises estatísticas, não foram verificadas associações significativas com a PCR das variáveis raça, sexo e idade. Isso pode ser decorrência do fato de existir apenas dois resultados positivos na PCR de um total de 200 animais analisados.

A prevalência amostral de *Cryptosporidium* spp. em fezes de cães foi de 1% (2/200). Os dois animais eram fêmeas, SRD, com idade entre 60 e 90 dias, apresentaram fezes pastosas e liquefeitas, de coloração castanha, sendo que uma era de origem residencial e outra fora resgatada pelo CCZ.

Por meio da PCR, no presente estudo, as infecções por *Cryptosporidium* foram menores que os resultados obtidos por Lallo et al., 2006 (9,5), Sevá et al., 2010 (10,7%), Thomaz et al., 2007 e Greca, 2010 no Brasil; de Abe et al., 2002 (9,3%) e Yoshiuchi et al., 2010 (3,9%), no Japão. Por outro lado, Sotiriadou et al., 2013, na Alemanha e Uehlinger et al., 2013 no Canadá detectaram menor taxa de positividade, 0,01% e 0,6%, respectivamente.

Em avaliaao de 129 cães, 65 fêmeas e 63 machos, com idade média de 5,5 anos, constatou-se positividade para o *Cryptosporidium* em dois, porém a PCR foi realizada em uma única amostra fecal, pois a outra continha material insuficiente para seu processamento (WANG et al., 2010).

Giangeroso et al., analisaram em 2006, na Itália, 240 amostras de fezes de cães e detectaram uma prevalência de 3,3% do protozoario.

Prevalência de *Cryptosporidium* na espécie canina tem sido considerada baixa em estudos epidemiológicos no Brasil, sendo mais frequente em filhotes (FIGUEIREDO et al., 2004, HUBER et al., 2005, LALLO & BONDAN, 2006, HAMNES et al., 2007, MUNDIM et al., 2007, BRESCIANI et al., 2008, SEVÁ et al., 2010).

Os filhotes dos animais, de qualquer espécie, apresentam o sistema imunológico prematuro, e isso faz com que, suas defesas não estejam prontas totalmente para lidar com parasitos e outros patógenos do ambiente. Quando antígenos penetram pela mucosa intestinal, ocorre decréscimo da resposta imunológica sistemica (SOBRINHO et al., 2012) e vários outros fatores propícios determinam um risco para a vida do filhote, podendo ser pela atitude curiosa dos cães jovens ou, especialmente, pela imaturidade do sistema imune dos mesmos (SILVA & ARAÚJO, 2013).

#### **4. CONCLUSÃO**

A ocorrência da criptosporidiose foi de 2% e a única espécie isolada foi molecularmente caracterizada como *C. canis*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; SAWANO, Y.; YAMADA, K.; KIMATA, I.; ISEKI, M. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. *Vet Parasitol* v.108, p.185-93, 2002.

ASSIS, D.C.; RESENDE, D.V.; SANTOS, M.C.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-SILVA, M.B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 55, n. 3, p. 149-154, 2013.

BOWMAN, D. D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 121-7, 2010.

BRESCIANI, K.D.S.; AMARANTE, A.F.T., LIMA, V.F.M., FEITOSA, M.M.; FEITOSA, F.L.F.; SERRANO, A.C.M. Infection by *Cryptosporidium* spp. in dogs from Araçatuba, SP, Brazil: Comparison between diagnostic methods and clinical and epidemiological analysis. *Vet. e Zoot* v.15, p.466-8, 2008.

CACCIÓ, S.; PINTER, E.; FANTINI, R.; MEZZAROMA, I.; POZIO, E. Human infection with *Cryptosporidium felis*: Case report and literature review. *Emerg Infect Dis*. v.6, p.85-6, 2002.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 5, p.237-251, 2013.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology* v. 124 n. 1, p. 90-97, 2010.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LAL, A.A.; DUBEY, J.P. *Cryptosporidium canis* n.sp. from domestic dogs. *J Parasitol* v.87, p.1415-22, 2001.

FIGUEIREDO, H.C.P.; JUNIOR, D.J.P; NOGUEIRA, R.B.; COSTA, P.R.S. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. Cienc. Rural v.34, p.1625-7, 2004.

GIANGASPERO, A.; IORIO, R.; PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; CAPELLI, G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. Parasitol Res, n. 99, p. 297–299, 2006.

GRECA, M. P. S. Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana. Dissertação (Mestrado em concentração Parasitologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, n.42, p.95-98, 1999.

HAMNES, I.S.; GJERDE, B.J.; ROBERTSON, L.J. A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. Acta Vet Scand v.49, p.1-10, 2007.

KARANIS, P.; ALDEYARBI, H.M. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. International Journal for Parasitology, v. 41, p. 1231–1242, 2011.

LALLO, M.A.; BONDAN, E.F. Prevalência de *Criptosporidium* em cães de instituições da cidade de São Paulo. Rev Saúde Púv v.40, p.120-5, 2006.

LIMBERT B. N. P.; MENEZES J. S.; FERNANDES S. S. P. Estudo de tríade: educação sanitária, posse responsável e bem-estar animal em animais de companhia em comunidades de baixa renda. Anuário da produção de iniciação científica discente, v.XII, n.13, 2009.

MUNDIM, M. J .S.; ROSA, L. A. G.; HORTÊNCIO, S. M.; FARIA, E. S. M.; RODRIGUES, R. M.; CURY, M. C. Prevalence of *Giardia duodenalis* and

*Cryptosporidium* spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 144, n. 31, p. 356-359, 2007.

SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2013.

Savioli, L.; Smith H.; Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. *Trends in Parasitology*, v.22, n.5 p. 203-208, 2006.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 249-253, 2010.

SILVA S. M. D.; ARAUJO F. A. P. Prevalence of infection by *Giardia* sp. in dogs in the municipality of Porto Alegre-RS, comparison between two populations: street dogs and dogs with owner in areas of social vulnerability. *J Health Sci Inst.* n. 31, v.1, p.99-103, 2013.

SMITH, H. V.; CACCIÓ, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, A. R. C. Tools for investigating the environment transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia infections* in humans. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006.

SMITH, R. P.; CHALMERS, K. E.; CLIFTON-HADLEY, A.; MUELLER-DOBLIES, D.; WATKINS, J.; PAIBA, G. A. Investigation of the role of companion animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health*, v. 56, p. 24-33, 2009.

SOBRINHO A. P.; PASCHOAL P. O.; SILVA P. S.; TEIXEIRA G. A. P. B. Avaliação da indução da resposta alérgica ao amendoim durante o período de desmame em camundongos. *Alim. Nutr.*, Araraquara v. 23, n. 3, p. 453-459, 2012.

SOTIRIADOU I.; PANTCHEV N.; GASSMANN D.; KARANIS P. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. *Parasite*, v.20, n.8, 2013.

THOMAZ, A.; MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; GENNARI. S. M. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, n. 150, p. 291–296, 2007.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK. Jeanmougin, F. F.; Higgins, D. G.. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.24, p.4876-4882. Dez. 1997.

UEHLINGER, F.D.; GREENWOOD, S.J.; MCCLURE, J. T.; CONBOY, G.; O'HANDLEY, R.; BARKEMA, H.W. Zoonotic potential of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. and prevalence of intestinal parasites in young dogs from different populations on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, 2013 (in press).

WANG, Y.; FENG, Y.; CUI, B.; JIAN, F.; NING, C.; WANG, R.; ZHANG, L.; XIAO, L. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitology Research*, v. 106, p. 341–347, 2010.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, 5492-5498, 2000.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 1, p. 72–97, 2004.

YOSHIUCHI R.; MATSUBAYASHI M.; KIMATA I.; FURUYA M.; TANI H.; SASAI K. Survey and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan. *Veterinary Parasitology*, v.174, p.313-316, 2010.